ISOLIERUNG UND CHARAKTERISIERUNG VON MENSCHLICHEM PANKREAS-KALLIKREIN AUS DUODENALSAFT

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin

an der Ludwig Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Walter Hofmann

aus

München

München ~~1982~~ 1983

Aus dem Institut für Klinische Chemie und Biochemie

Leiter: Prof.Dr.rer.nat. H. Fritz

ISOLIERUNG UND CHARAKTERISIERUNG VON MENSCHLICHEM PANKREAS-KALLIKREIN AUS DUODENALSAFT

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin

an der Ludwig Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Walter Hofmann

aus

München

München 1982

Mit Genehmigung des Fachbereichs Medizin
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. H. Fritz

Mitberichterstatter:

Dekan: Prof. Dr. W. Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 7.6.1984

Gliederung

	Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen	1
	Zusammenfassung	2
1.	Einleitung und Zielsetzung	4
1.1	Einleitung	4
1.2	Aufgabenstellung	7
2.	Material und Methoden	8
2.1	Material	8
2.2	Methoden	10
3.	Vorversuche	21
4.	Ergebnisse	27
4.1	Isolierung von menschlichem Pankreas-Kallikrein	
4.2	Charakterisierung von menschlichem Pankreas-Kallikrein	31
4.2.1	Chemische und physikochemische Eigenschaften	31
4.2.2	Enzymatische Eigenschaften	37
4.2.3	Hydrophobe Wechselwirkung	40
5.	Diskussion	44
	Literaturverzeichnis	52
	Lebenslauf	58

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41534901_0030

Abkürzungen

BzArgNHNp	= N^{α}-Benzoyl-L-Arginin-p-nitroanilid
AcPheArgOEt	= N^{α}-Acetyl-L-Phenylalanyl-L-Arginin-äthylester
DValLeuArgNHNp	= D-Valyl-L-Leucyl-L-Arginin-p-nitroanilid
CbzTyrONp	= N^{α}-Benzyloxycarbonyl-L-Tyrosin-p-nitrophenylester
SBTI	= Sojabohnen-Trypsininhibitor (Kunitz)
LBTI	= Limabohnen-Trypsininhibitor
HPaK	= menschliches Pankreas-Kallikrein (human pancreatic kallikrein)
HUK	= menschliches Harn-Kallikrein (human urinary kallikrein)
HMW-Kininogen	= hochmolekulares Kininogen
IgG	= Immunglobulin G
ADH	= Alkoholdehydrogenase
K_i	= Dissoziationskonstante des Enzym-Inhibitor-Komplexes (mol/l)
K_m	= Michaelis-Menten-Konstante (mol/l)
KE	= biologische Kallikrein-Einheit (22)
KIE	= Kallikrein-Inhibitor-Einheit; 1 KIE entspricht der Hemmung von 1 KE
AcPheArgOEt-U	= Umsatz von 1 μmol AcPheArgOEt/min
Kininogen-U/E_{280}	= Umsatz von 1 μmol Kininogen/min/E_{280}
CNBr	= Cyanbromid
DFP	= Diisopropylfluorophosphat
DTT	= Dithioerythritol
EDTA	= Äthylendiaminotetraacetat
NAD	= Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid
SDS	= Natriumdodecylsulfat
Tris	= Trishydroxyaminomethan
HPLC	= High pressure liquid chromatography

(Bei den Abkürzungen wurden möglichst die Nomenklaturrichtlinien der IUPAC und IUB berücksichtigt.)

Zusammenfassung

Biochemie des menschlichen Pankreas-Kallikrein

Mit der hier beschriebenen, gut reproduzierbaren, neu entwickelten Methode wurde in nur zwei Schritten, der Ionenaustauschchromatographie an DEAE-Sepharose und der Affinitätschromatographie an Anti-HUK-γ-Globulin-Sepharose, aus menschlichem Duodenalsaft Pankreas-Kallikrein elektrophoretisch einheitlich isoliert. Die erhaltenen Präparationen wurden anschließend biochemisch charakterisiert.

Für die Spaltung von AcPheArgOEt wurde eine spezifische Aktivität von 1000 U/mg Protein ermittelt. Im Hundeblutdrucktest erhält man eine biologische Aktivität von 1310 KE/mg Protein, im Rattenuterustest ergab sich nach Kininfreisetzung aus hochmolekularem menschlichem Kininogen eine biologische Aktivität von 0,361 U/mg, was einer Freisetzung von 0,383 µg Bradykininäquivalenten pro Minute entspricht.

Bei der Gelfiltration wurde ein Molekulargewicht von 40000 ermittelt, während in der SDS-Elektrophorese ein Molekulargewicht von 27000 erhalten wurde.

Die Aminosäurezusammensetzung wurde bestimmt und Isoleucin als N-terminale Aminosäure identifiziert.

HPaK besitzt die für aktive Serinproteinasen typische N-terminale Aminosäuresequenz Ile-Val-Gly-Gly.

Bei der isoelektrischen Fokussierung wurden vier Proteinbanden mit isoelektrischen Punkten von 5,60, 5,65, 5,70 und 5,85 gefunden.

Die kinetischen Konstanten der Spaltung von AcPheArgOEt und DValLeuArgNHNp, sowie physikalisch-chemische Daten wie Stabilität, Temperaturempfindlichkeit und pH-Optimum der enzymatischen Aktivität wurden bestimmt.

Die Geschwindigkeitskonstante der Inhibierung des Enzyms durch DFP betrug 10,5 l x mol^{-1} x min^{-1}.

Die Dissoziationskonstante K_i des HPaK-Aprotinin-Komplexes wurde zu 1,5 x 10^{-10} mol/l berechnet.

Die in der isoelektrischen Fokussierung auftretenden multiplen Enzymformen sind auf Heterogenitäten des Kohlehydratanteils zurückzuführen.

Aktivierungsexperimente mit Amphiphilen und Interaktionen mit Medien der hydrophoben Wechselwirkungschromatographie, wie Octyl- und Phenyl-Sepharose, deuten auf das Vorkommen hydrophober Bereiche im HPaK-Molekül hin.

1. Einleitung und Zielsetzung

1.1 Einleitung

Bereits zu Beginn des Jahrhunderts (1909) wurde von Abelous und Bardier (1) beobachtet, daß verschiedene Harnfraktionen nach intravenöser Injektion den Blutdruck von Versuchstieren senken bzw. erhöhen können.

Auf der Suche nach der Ursache für die postoperative Reflexanurie fand der Chirurg E.K. Frey (19) 1925, daß intravenöse Injektion von Hunde- und Menschenharn bei betäubten Hunden vorübergehend eine Blutdrucksenkung hervorruft. Im Verlauf weiterer systematischer Arbeiten konnten Frey und sein Mitarbeiter Kraut eine Substanz (F- oder Frey-Substanz) isolieren, die diese blutdrucksenkende Wirkung zeigte. Der sich der Gruppe von Frey 1927 anschließende Werle fand, daß das Pankreas vom Rind, Schwein und Menschen große Mengen dieser Substanz enthielt (20). Da man im Pankreas den Ursprungsort für das Enzym vermutete, wurde die F-Substanz nach einem griechischen Synonym für Pankreas "Kallikrein" genannt. Zehn Jahre später konnte Werle zeigen, daß es sich beim Kallikrein um ein Enzym handelt, das Effektorsubstanzen aus inaktiven Plasmavorstufen freisetzen kann (49). Bei diesen Effektorsubstanzen handelt es sich um Kinine, die durch Einwirkung von Kallikrein aus Kininogen entstehen (39, 46). Diese Kinine (Bradykinin, Kallidin) sind pharmakologisch hochwirksame Polypeptide, die bei Versuchstieren eine Vielzahl von biologischen Wirkungen, z.B. Steigerung des Herzzeitvolumens oder Dilatation der Coronargefäße hervorrufen (21).

Erst 1962 wurde der letzte Baustein des Kallikrein-Kinin-Systems, die Kininasen (Bradykinin-, Kallidin-abbauende Enzyme) entdeckt (9, 34). Somit besteht das Kallikrein-Kinin-

System aus vier Bestandteilen, den Kallikreinen oder Kininogenasen, den Kininogenen, den Kininen und den Kininasen (22, 35) (vgl. Tab. 1).

Bedingt durch die Natur der verschiedenen Kallikreine kann man zwei voneinander unabhängige Systeme unterscheiden, das Plasma-Kallikrein-Kinin-System und das Gewebs-(Organ-, Drüsen-) -Kallikrein-Kinin-System. Das Plasma-Kallikrein kommt im Blut vor, Gewebs-Kallikreine im Pankreas, in der Speicheldrüse, im Darm, in der Niere und im Harn (7, 8) sowie im Blut (32) und im Seminalplasma (31).

In Tabelle 1 sind die charakteristischen Eigenschaften von Plasma- und Gewebs-Kallikreinen gegenübergestellt.

	Plasma-Kallikrein	Gewebs-Kallikrein
Molekulargewicht Isoelektrischer Punkt DFP-Inaktivierungskonstante (l/mol·min)	85 000 7,7 - 9,4 320 ± 20	25 000 - 35 000 3,75 - 5,85 8 - 10,5
Freigesetztes Kinin	Bradykinin	Kallidin
Substrat	HMW-Kininogen Prorenin Hageman-Faktor (FXII)	LMW-Kininogen
Inhibitoren (S) Soforttyp-Hemmung (F) Progressiv-Hemmung	C1-Inaktivator (S) Antithrombin III + Heparin (S) α_2-Makroglobulin (S) α_1-Proteinaseinhibitor (F)	α_1-Proteinaseinhibitor (F)
Vorkommen	Blut	Körperflüssigkeiten (Blut, Harn, Seminalplasma, Speichel, Pankreassaft) und Gewebe (Speicheldrüse, Pankreas, Niere, Dick- und Dünndarm)
Funktion	Faktor des Blutgerinnungssystems	Beteiligung an physiologischen Körperfunktionen (z.B. Glucoseaufnahme in der Zelle)

Tab. 1 Vergleich einiger charakteristischer Eigenschaften der Plasma- und Gewebs-Kallikreine (29).

Am besten untersucht sind bisher die Gewebs-Kallikreine des Schweines (15). Hierbei stellte sich heraus, daß Speicheldrüsen-, Harn- und natives Pankreas-Kallikrein aus einer einzigen Proteinkette (α-Kallikrein) mit einem Molekulargewicht von ca. 30000 (25) besteht. Aus autolysiertem Pankreasgewebe isoliertes Pankreas-Kallikrein enthält dagegen Spaltstellen im Molekül (β-Kallikrein: eine Spaltstelle, γ-Kallikrein: eine weitere Spaltstelle in der grösseren Kette des β-Kallikreins). Alle Gewebs-Kallikreine sind Glykoproteine, die je nach Kohlehydratanteil und internen Spaltstellen in der Proteinkette bei der isoelektrischen Fokussierung multiple Formen bilden (Abb. 1).

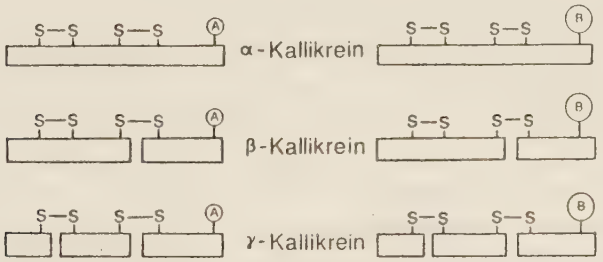

Abb. 1 Schematische Darstellung der multiplen Formen der Gewebs-Kallikreine des Schweines.
A = Kohlenhydratanteil des Kallikrein A,
B = Kohlenhydratanteil des Kallikrein B,
S-S = Disulfidbrücken.

Die Aminosäurezusammensetzung, sowie die N-terminale Primärstruktur von Pankreas-, Speicheldrüsen- und Harn-Kallikrein des Schweines sind identisch (15). Alle bekannten Schweine-Gewebs-Kallikreine zeigen gegenseitige immunologische Kreuzreaktionen (25). Diese enge immunologische Verwandtschaft zeigen auch die Gewebs-Kallikreine des Menschen, so daß Antikörper, die spezifisch gegen Harn-Kallikrein ge-

richtet sind, menschliche Kallikreine des Harn, Speichel, Dickdarm und Pankreas präzipitieren.

1.2 Aufgabenstellung

Das Harn-Kallikrein des Menschen ist von den menschlichen Gewebs-Kallikreinen das bisher am besten charakterisierte Kallikrein (29). Von den Kallikreinen der Speicheldrüse und des Pankreas sind nur wenige Daten verfügbar, die sich zum Teil sogar widersprechen. Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit durchgeführten Untersuchungen sollten zur Klärung dieser Widersprüche beim Pankreas-Kallikrein beitragen.

Voraussetzung war die Entwicklung eines relativ einfachen Verfahrens, der Immunaffinitätschromatographie für Kallikreine (32), um eindeutig charakterisiertes HPaK (Sequenz, N-Terminus) zu isolieren. Daran sollte sich eine klare Charakterisierung dieses Materials, d.h. Ermittlung der enzymatischen, chemischen und physikochemischen Eigenschaften, anschließen.

2. Material und Methoden

2.1 Material

Sephadex G-25, Sephadex G-100, DEAE-Sepharose, CNBr-aktivierte Sepharose, Octyl- und Phenyl-Sepharose waren Substanzen der Fa. Pharmacia Fine Chemicals, Upsalla, Schweden. Ultrogel AcA-44 war ein Produkt der Firma LKB. Bradykinin, Lys-Bradykinin und Met-Lys-Bradykinin wurden von der Fa. Bachem, Bubendorf, Schweiz und DFP wurde von der Fa. Sigma, St. Louis, USA geliefert. Die für die Elektrophoresen benötigten Chemikalien, DTT, sowie Servalyte und die verwendeten Detergenzien wurden von der Fa. Serva, Heidelberg bezogen. Benzamidinhydrochlorid und alle weiteren Substanzen waren Produkte der Fa. Merck, Darmstadt.

Alle verwendeten Substanzen wurden in der Form 'p.A.' oder 'biochem. rein' verwendet.

Biologisches Material

Duodenalsaft

Die Gewinnung des Duodenalsaftes, der vorwiegend aus Pankreassekret, sowie aus Galle und Absonderungen der Brunnerschen Drüsen besteht, erfolgt mit einer doppelläufigen Dreiling-Sonde, die unter Röntgenkontrolle so in das Duodenum eingeführt wird, daß die Sondenspitze in Höhe des Treitzschen Bandes lag. Die beiden Sondenanteile ermöglichen die getrennte Gewinnung von Magen- und Duodenalsaft; die Absaugung erfolgte mit einer Membransaugpumpe. Der gewonnene Duodenalsaft wurde sofort mit Eis gekühlt und anschließend bei -20°C tiefgefroren. Der Duodenalsaft wurde in der Med. Klinik Innenstadt der Universität München (45) sowohl von Gesunden, wie auch von Patienten mit gesicherten Pankreaserkrankungen gewonnen.

Inhibitoren

SBTI und LBTI waren Produkte der Fa. Serva, Heidelberg. Aprotinin, die aktive Substanz des Arzneimittels Trasylol^{R} wurde von der Fa. Bayer AG, Wuppertal-Elberfeld zur Verfügung gestellt.

Substrate

BzArgNHNp war ein Produkt der Fa. E. Merck, Darmstadt. CbzTyrONp wurde von der Fa. Serva, Heidelberg bezogen. DVal-LeuArgNHNp wurde von der Fa. Kabi, Mölndal, Schweden zur Verfügung gestellt. AcPheArgOEt wurde nach Fiedler et al. (13) synthetisiert. HMW-Kininogen wurde von Dr. B. Dittmann, München bereitgestellt.

Enzyme

Schweine-Pankreas-Kallikrein (1030 KE/mg) war ein Geschenk von Dr. G. Schmidt-Kastner, Bayer AG, Wuppertal-Elberfeld. Trypsin vom Rind wurde von Boehringer Mannheim bezogen.

2.2 Methoden

SDS-Elektrophoresen

Die SDS-Elektrophoresen wurden nach Vorschriften von Weber und Osborn (48) durchgeführt. Ein Teil der Proben wurde vor dem Elektrophoreselauf mit 1 % (w/v) Dithioerythrit im Elektrophoresepuffer zwei Minuten bei 100°C reduziert. Die Anfärbung der Proteinbanden in den Gelen erfolgte mit Coomassie Brilliant Blue G-250 (Serva, Heidelberg).

Isoelektrische Fokussierung

Zur Bestimmung der isoelektrischen Punkte wurde nach der Methode von Jörg (38) verfahren.

Enzymbestimmungen

Gewebs-Kallikreine

Die Enzymaktivität der menschlichen Gewebs-Kallikreine wurde mit unterschiedlichen biochemischen und biologischen Methoden bestimmt.

Hunde-Blutdruck-Test (22)

Die Änderung des mittleren arteriellen Blutdrucks nach i.v. Injektion einer Probe diente als Maß für den Kallikreingehalt. Nach Einführung von Kathetern in die Arteria femoralis (Blutdruckmessung) und Vena femoralis (Applikation der Proben) wurde im Vergleich mit einer Standard-Kallikrein-Lösung (hochgereinigtes Schweine-Pankreas-Kallikrein der Bayer AG, Leverkusen) anhand der Blutdruckänderung der Kallikrein-

gehalt unbekannter Proben ermittelt. Die zur Aktivitätsangabe verwendete Kallikrein-Einheit KE (engl. KU) ist wie folgt definiert: 1 KE entspricht der Blutdrucksenkung, die durch Injektion von 5 ml Sammelurin (Bedingung: Menge 50 l; gesunde Spender; Urin muß 24 h gegen fließendes Wasser dialysiert werden) verursacht wird.

Ratten-Uterus-Test (41)

Die nach Umsetzen mit Kallikrein aus Kininogen freigesetzten Kinine üben eine kontrahierende Wirkung auf den Ratten-Uterus aus. Die Stärke der Kontraktion (über einen Schreiber registriert) ist ein Maß für den Kiningehalt. Zur Bestimmung des Kiningehalts wurden aliquote Proben in ein mit Jalon'scher Lösung beschicktes Gewebebad, das ein zur Messung vorbereitetes Uterusstück enthielt, injiziert und die Kontraktion mit der eines Bradykinin-Standards verglichen.

Radioimmunoassay für HPaK

Radioimmunologisch wurde HPaK analog der Vorschrift von Mann et al. (42) bestimmt.

Bestimmung der Kallikrein-Aktivität mit Substraten

Die Enzymaktivität der menschlichen Gewebs-Kallikreine wurde mit den synthetischen Substraten DValLeuArgNHNp, AcPheArgOEt und CbzTyrONp bestimmt. Falls nicht ausdrücklich erwähnt, ist die Enzymeinheit U wie folgt definiert: Umsatz von 1 µmol Substrat pro Minute unter den jeweils angegebenen Reaktionsbedingungen.

Substrat DValLeuArgNHNp

Aus dem Substrat freigesetztes Nitroanilin wird photometrisch bei 405 nm bestimmt (28).

Testansatz (37°C; 405 nm)	
0,4 ml	0,4 mol/l Tris/HCl, pH 8,2
x ml	Kallikrein-Lösung
(0,5 - x) ml	bidest. Wasser
5 min bei 37°C vorinkubieren	
0,1 ml	0,001 mol/l DValLeuArgNHNp
30 min bei 37°C vorinkubieren	
0,1 ml	4 mol/l Essigsäure

Die nach Inkubation bei 37°C gegen einen Leerwert (Enzym-Lsg. durch Wasser ersetzt) gemessene Extinktionsänderung von 0,278 ΔE/30 min (ϵ = 10200 $M^{-1}cm^{-1}$; (13)) entspricht 1 mU.

Substrat AcPheArgOEt

Das Prinzip des Tests ist mit dem des BzArgOEt-Tests identisch (13, 28).

Testansatz (25°C; 366 nm)	
1,00 ml	60 mmol/l Natriumpyrophosphatpuffer, enthält 60 mmol/l Semicarbazidhydrochlorid und 18 mmol/l Glycin, pH 8,7
0,05 ml	15 mmol/l AcPheArgOEt
0,05 ml	30 mmol/l NAD
0,01 ml	ADH (ca. 300 U/mg)
(0,39 - x) ml	bidest. Wasser
5 min bei 25°C vorinkubieren	
x ml	Kallikrein-Lösung

1 U entspricht der Extinktionsänderung von 2,93 ΔE/min (ϵ = 3,44 x 10^3 $M^{-1}cm^{-1}$; (51)) bei 25°C.

Substrat CbzTyrONp

Das beim Umsatz abgespaltene Nitrophenol wird bei 405 nm photometrisch bestimmt (13).

Testansatz (37°C; 405 nm)	
2,20 ml	0,2 mol/l Tris/HCl, pH 8,0
0,30 ml	0,025 mmol/l CbzTyrONp
(0,5 - x) ml	bidest. Wasser
5 min bei 37°C	vorinkubieren
x ml	Kallikrein-Lösung

Eine Extinktionsänderung von 5,4 ΔE/min (ϵ = 16240, Merck Biochemica, Präparate für Biochemie, Seite 100) gemessen gegen einen Leerwert (Wasser anstelle von Enzym) entspricht 1 U.

Trypsin

Die Aktivitätsbestimmung des Trypsins wurde mit BzArgNHNp durchgeführt. Dabei wird das freigesetzte Nitroanilin bei 405 nm photometrisch bestimmt (24).

Testansatz (25°C; 405 nm)	
(0,80 - x) ml	0,2 mol/l Tra-Puffer, pH 7,8, enthält 0,02 mol/l $CaCl_2$
x ml	Trypsin-Lösung
5 min bei 25°C	vorinkubieren
0,2 ml	4 mmol/l BzArgNHNp

1 U Trypsin entspricht einer Extinktionsänderung von $\Delta E/min = 10,2$ ($\epsilon = 10200\ M^{-1}cm^{-1}$; (13)) im 1 ml Ansatz.

Hemmung der Enzymaktivitäten

Gewebs-Kallikreine

DFP-Inaktivierung (11)

Die Diisopropylierung des Serinrestes im aktiven Zentrum der menschlichen Gewebs-Kallikreine mit DFP wurde wie folgt durchgeführt (25°C; pH 7,2; 1,1 mmol/l DFP):

0,55 ml	0,1 mol/l Natriumphosphatpuffer, pH 7,2, enthält 1 mmol/l EDTA
0,05 ml	Kallikrein-Lösung
5 min vorinkubieren bei 25°C	
0,01 ml	57 mmol/l DFP (5 µl DFP und 495 µl Isopropylalkohol)

Nach Vorinkubation der Kallikrein-Lösung bei 25°C wurden zur Bestimmung der Kallikrein-Aktivität (100%-Wert) mittels CbzTyrONp 0,1 ml entnommen, die DFP-Lösung zum Ansatz gegeben und in zeitlichen Abständen Proben für den Aktivitätstest (Substrat: CbzTyrONp) entnommen. Die Kallikreinmenge wurde so dosiert, daß im AcPheArgOEt-Test eine Anfangsaktivität von $\Delta E/min = 0,022$ erhalten wurde.

Titration mit Inhibitoren

Die Hemmung der menschlichen Gewebs-Kallikreine durch Benzamidiniumchlorid, Aprotinin und SBTI wurde mittels des auf Seite 12 beschriebenen AcPheArgOEt-Tests bestimmt.

1,00 ml	60 mmol/l Phosphatpuffer
0,10 ml	Inhibitor-Lösung
0,05 ml	30 mmol/l NAD
0,01 ml	ADH (ca. 300 U/mg)
x ml	Kallikrein-Lösung
(0,29 - x) ml	bidest. Wasser
10 min bei 25°C vorinkubieren	
0,05 ml	15 mmol/l AcPheArgOEt-Lösung

Zur Erstellung einer Titrationskurve wurden zu einer konstanten Kallikreinmenge zunehmende Inhibitormengen gegeben.

Trypsin

Titration mit Inhibitoren (24)

Die Hemmung der Trypsinaktivität wurde analog zu den auf Seite 13 beschriebenen Tests durchgeführt (25°C; 405 nm).

(0,75 - x) ml	Tra-Puffer, pH 7,8
0,05 ml	Trypsin-Lösung
x ml	Inhibitor-Lösung (Aprotinin)
15 min bei 25°C vorinkubieren	
0,2 ml	4 mmol/l BzArgNHNp-Lösung

Eine Extinktionsänderung von $\Delta E/min = 10{,}2$ ($\epsilon = 10200$; (13)) im 1 ml Ansatz entspricht 1 U Trypsin. Entsprechend vermindert 1 Inhibitoreinheit (IU) den $\Delta E/min$-Wert um denselben Betrag. Die Hemmaktivität der Inhibitorlösung errechnet sich nach:

$$IU = \left((\Delta E/min)_{Trypsin} - (\Delta E/min)_{Inhibitor}\right) \times 0{,}098$$

Biochemische Arbeitsmethoden

Gel-, Ionenaustausch- und hydrophobe Wechselwirkungs-chromatographie

Die Durchführung der Chromatographien erfolgte nach Vorschriften der Fa. Pharmacia Fine Chemicals.
Die jeweils verwendeten Füllmaterialien, Puffer und Chromatographiebedingungen werden detailliert in der Sektion "Ergebnisse" angegeben.

Affinitätschromatographie

Zur HPaK-Isolierung wurde Sepharose-gebundenes Anti-HUK-γ-Globulin als spezifisches Absorbens für die Affinitätschromatographie verwendet.

Zu den Vorversuchen wurden sogenannte "Minisäulen" verwendet (5 x 0,6 cm). Hierbei wurden Pasteurpipetten mit etwas Glaswolle und 1,4 ml Sepharose-gebundenes Anti-HUK-γ-Globulin gefüllt. Anschließend wurde wie folgt verfahren:

1. Spülen der "Minisäule" mit 10 ml 0,025 mol/l KH_2PO_4, 0,025 mol/l Na_2HPO_4, 0,75 mol/l NaCl, pH 7,0
2. Aufpumpen des Duodenalsaftes ~3,5 AcPheArgOEt-U

3. Spülen mit 10 ml 0,025 mol/l KH_2PO_4, 0,025 mol/l Na_2HPO_4, 0,75 mol/l NaCl, pH 7,0
   $E_{280} < 0,0005$
4. 10 ml 4 mol/l NaSCN
5. Spülen mit 10 ml 0,025 mol/l KH_2PO_4, 0,025 mol/l Na_2HPO_4, 0,75 mol/l NaCl, pH 7,0

Die Anti-HUK-γ-Globulin-Sepharose hatte eine Bindungskapazität von 0,29 AcPheArgOEt-U/ml Gel. Die zur präparativen Isolierung verwendete IgG-Sepharose-Säule besaß eine Bindungskapazität von 75 AcPheArgOEt-U/ 260 ml Gel.

Synthese der Anti-HUK-γ-Globulin-Sepharose

4,6 g CNBr-aktivierte Sepharose 4B wurde mit 1 l 1 mmol/l HCl auf einem Glasfilter gequollen und gewaschen. Eine Lösung von 160 mg Anti-HUK-γ-Globulinfraktion in 2 ml 0,1 mol/l $NaHCO_3$, pH 8,3, die 0,5 mol/l NaCl enthielt (Titer der Lösung: 1 ml bindet 3,5 mg HUK), wurde dazugegeben und die Mischung 2 h bei Raumtemperatur bewegt. Überschüssiges Protein wurde entfernt und noch vorhandene reaktive Gruppen wurden durch Zugabe von 20 ml 1 mol/l Äthanolamin bei 2 h Schütteln bei Raumtemperatur blockiert. Die IgG-Sepharose wurde mit 1 l 0,1 mol/l $NaHCO_3$, pH 8,3, das 0,5 mol/l NaCl enthielt, gewaschen und bis zur Verwendung in Phosphatpuffer (0,025 mol/l Na_2HPO_4, 0,025 mol/l KH_2PO_4, 1 mol/l NaCl, 0,2 % (w/v) Natriumazid, pH 7,0) bei 4°C aufbewahrt. Die Anti-HUK-γ-Globulin-Sepharose hatte eine Bindungskapazität von 0,29 AcPheArgOEt-U/ml Gel.

Aminosäurenanalysen

Zur Durchführung von Aminosäurenanalysen wurden Proben mit 5,7 N HCl bei 110°C für 24 h hydrolysiert und anschliessend mittels eines Durrum D 500 analysiert.

N-terminale Aminosäuresequenz

Zur Sequenzierung des HPaK wurde der an den Sequenator angepaßte Edman-Abbau (6) verwendet. Zur Identifizierung der Phenylthiohydantoin-Aminosäuren diente ein isokratisches HPLC-Trennsystem (36).

Bestimmung von Enzymkonstanten

K_m- und V_{max}-Werte wurden nach der Methode von Wilkinson (50) nach graphischer Begutachtung der Werte in Lineweaver-Burk-Diagrammen ermittelt.

Die Dissoziationskonstante (K_i) der Kallikrein-Aprotinin-Komplexe wurde graphisch nach Green und Work (33) ermittelt.

Die bimolekulare Geschwindigkeitskonstante der Inhibierung des Kallikreins durch DFP wurde nach Fiedler (11) bestimmt.

Molekulargewichtsbestimmungen

Das Molekulargewicht von HPaK wurde mittels Gelfiltration und SDS-Elektrophorese bestimmt.

Gelfiltration

Das HPaK wurde über Ultrogel AcA-44 gelfiltriert.

Säulendimensionen	:	0,9 x 115 cm
Puffer	:	0,1 mol/l Ammoniumformiatpuffer, pH 7,0
Flußgeschwindigkeit	:	2 ml/h

SDS-Elektrophoresen

Die SDS-Elektrophoresen wurden in Analogie zu der auf Seite 10 angegebenen Methode durchgeführt. Als Vergleich diente ein Molekulargewichts-Standard der Fa. Bio-Rad (Richmond, Kalifornien).

Untersuchungen in Anwesenheit von Amphiphilen

Aktivierungsexperimente mit Amphiphilen

Die Aktivierung von HPaK durch Amphiphile wurde wie folgt durchgeführt:

0,1 ml	Kallikrein-Lösung
0,1 ml	Amphiphil-Lösung in 0,15 mol/l Natrium-pyrophosphat-Puffer, pH 7,4

15 min bei 25°C vorinkubieren

Nach der Inkubation wurde der Ansatz zum AcPheArgOEt-Test-System (vgl. Seite 12) zugesetzt, das die Hälfte der Amphiphilen-Konzentration des Vorinkubationsansatzes enthielt; das Endvolumen betrug durch Reduktion des Puffervolumens 1,5 ml.

Hemmstudien in Anwesenheit von Amphiphilen

Die Inhibierungsexperimente wurden analog zu dem auf Seite 15 beschriebenen Test durchgeführt. Dem Phosphatpuffer wurde das Amphiphil in einer 1,5 mal höheren Konzentration als oben angegeben zugesetzt, um bei 1,5 ml Küvettenvolumen die gewünschte Amphiphilenkonzentration zu erreichen.

Optimale Reaktionsbedingungen für das menschliche Pankreas-Kallikrein

Zur Bestimmung der optimalen Reaktionsbedingungen für HPaK wurde das pH-Optimum, die Temperaturstabilität und die pH-Beständigkeit untersucht.

pH-Optimum

Die Untersuchung des pH-Optimums erfolgte mit CbzTyrONp und DValLeuArgNHNp als Substrate. Die Aktivitätstests wurden wie auf Seite 12/13 beschrieben durchgeführt. Die pH-Werte der Testsystempuffer wurden wie benötigt verändert.

Temperaturstabilität

HPaK-Lösungen wurden jeweils 15 min bei verschiedenen Temperaturen inkubiert und anschließend unter normalen Testbedingungen auf Enzymaktivität (Substrat: AcPheArgOEt) untersucht.

pH-Beständigkeit

HPaK-Proben wurden 10 min bei unterschiedlichen pH-Werten in Phosphatpuffer inkubiert und danach wurde unter definierten Testbedingungen die Enzymaktivität (Substrat: AcPheArgOEt; 25°C) gemessen.

Proteinbestimmung

Proteinbestimmungen wurden nach der Methode von Folin und Ciocalteau (18) durchgeführt.

3. Vorversuche

Im Duodenum wird die Nahrung mit den Sekreten des Pankreas, der Galle und den Darmsäften vermischt. Der Speisebrei wird neutralisiert und die Hauptverdauungsprozesse werden in Gang gesetzt. An den Verdauungsprozessen sind vorwiegend die Pankreasenzyme beteiligt, die bei neutralem bis leicht alkalischen pH-Wert optimal wirken. Zu diesen Pankreasenzymen zählen u.a. Trypsin, Chymotrypsin und Elastase. Diese proteolytisch wirksamen Enzyme setzen nicht nur körperfremdes/aufgenommenes Protein um, sondern können auch körpereigenes angreifen. Um bei der Isolierung von HPaK aus Duodenalsaft die proteolytische Aktivität, die unspezifisch HPaK abbauen könnte, möglichst niedrig zu halten, wurde der Duodenalsaft schon während des Auftauens mit Inhibitoren (SBTI und LBTI) versetzt. Diese Inhibitoren zeigen eine ausgezeichnete Hemmwirkung u.a. gegenüber Trypsin, Chymotrypsin und Elastase, hemmen aber menschliche Gewebs-Kallikreine nicht (24). So konnte nach Zugabe einer Inhibitormenge von 0,125 g SBTI und 0,125 g LBTI pro 200 ml Duodenalsaft keine Abnahme der AcPheArgOEt-spaltenden Aktivität, die unter diesen Bedingungen vor allem HPaK-Aktivität repräsentiert, über mehrere Stunden bei Raumtemperatur festgestellt werden. Der Abbau von HPaK konnte somit weitgehend verhindert werden.

Um bakterielles Wachstum und einen dadurch möglichen weiteren unspezifischen Abbau von HPaK zu verhindern, wurde der Duodenalsaft noch während des Auftauens mit 0,25 % (w/v) NaN_3 versetzt.

Der mit Inhibitoren und NaN_3 versetzte, aufgetaute und zentrifugierte Duodenalsaft (nähere Angaben unter 4.1 Isolierung) wurde analog zu den Versuchen zur Isolierung von Gewebs-Kallikrein aus menschlichem Plasma (32) auf eine IgG-Sepharose-Säule, die zuvor mit Phosphatpuffer (0,025 mol/l Na_2HPO_4, 0,025 mol/l KH_2PO_4, 1,0 mol/l NaCl, pH 7,0) äquilibriert worden war, aufgepumpt und mit dem oben genannten

Phosphatpuffer gespült, bis Proteinfreiheit des Eluats erreicht war ($E_{280} < 0{,}0005$). Pankreas-Kallikrein sollte anschließend durch einen Glycin/HCl-Puffer, pH 2,5, abgelöst werden. Durch Vorlage von jeweils 0,5 ml 0,5 mol/l NaCl, 0,5 mol/l Phosphatpuffer, pH 8,0, pro Fraktion wurde die Lösung sofort auf pH 7,0 eingestellt.

Interessanterweise konnte jedoch nach Elution mit Glycin/HCl, pH 2,5, keine HPaK-Aktivität (Substrat: AcPheArgOEt) gemessen werden. Wie aus späteren Untersuchungen am reinen HPaK hervorgeht, findet bei einem pH von 2,5 eine schnelle Inaktivierung des HPaK statt. Deshalb ist es retrospektiv nicht überraschend, daß trotz Vorlage des Phosphatpuffers keine AcPheArgOEt-spaltende Aktivität gefunden werden konnte.

Statt des Glycin/HCl-Puffers wurde nun mit 4 mol/l NaSCN abgelöst. Durch Verwendung dieses Ablösereagenz konnte nun die gesamte aufgetragene HPaK-Aktivität wieder eluiert werden. Es zeigte sich jedoch, daß durch wiederholtes Auftragen HPaK-enthaltenden Duodenalsaftes die Bindung von HPaK an Gewebs-Kallikrein-spezifische IgG-Sepharose stetig abnahm (Abb. 2b). Bedingt durch die begrenzte Menge an Gewebs-Kallikrein-spezifischer IgG-Sepharose wurde dabei so verfahren, daß der während des Beschickens der IgG-Sepharose erhaltene Durchlauf, sowie ein Teil der Spüllösung immer wieder auf dieselbe IgG-Sepharose-Säule aufgebracht wurde. Die in Abb. 2a dargestellte Verfahrensweise soll dies näher erläutern.

Zur Erklärung dieser Beobachtung müssen mehrere Ursachenkomplexe diskutiert werden:

1. Abbau von HPaK durch proteolytische Aktivitäten während der Chromatographien
2. Denaturierung von HPaK durch Duodenalsaftbestandteile, z.B. Gallensäuren
3. Chemische Umsetzung des Säulenmaterials durch NaSCN
4. Abbau von Sepharose-gebundenen Antikörpern durch Spu-

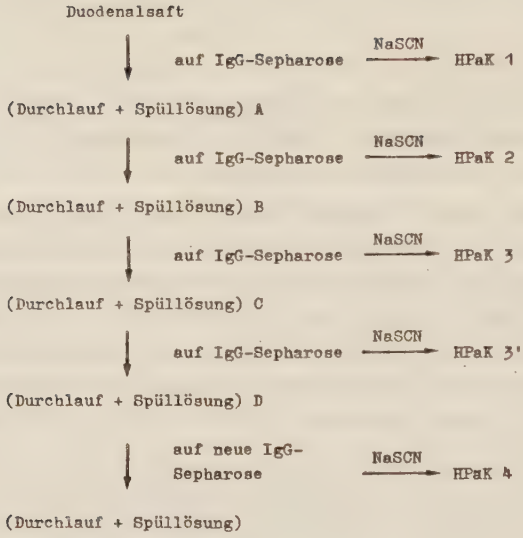

Abb. 2a

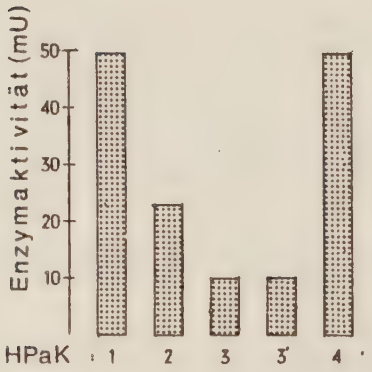

Abb. 2b Abnahme der Gesamtbindungskapazität in mU bei wiederholtem Auftrag des Duodenalsaftes auf dieselbe IgG-Sepharose. Bei HPaK 4 wurde eine neue IgG-Sepharose verwendet.

ren von Proteasen

5. Unspezifische Wechselwirkung von Duodenalsaftbestandteilen, wie z.B. Proteinen oder Fetten, mit der IgG-Sepharose (sterische Behinderung)
6. Konformationsänderung der Antikörper bzw. des gesamten Säulenmaterials durch Duodenalsaftbestandteile

Versuche, die zur Klärung des Sachverhaltes durchgeführt wurden, zeigten, daß ein Abbau von HPaK durch proteolytische Aktivitäten des Duodenalsaftes die Abnahme der Bindungskapazität nicht erklären kann, da die Summe der Aktivitäten (Substrat: AcPheArgOEt) von HPaK 1 und (Durchlauf + Spüllösung) A (Abb. 2a) der Ausgangsaktivität entsprach.

Auch Denaturierung oder Konformationsänderungen des Kallikrein-Moleküls durch Bestandteile des Duodenalsaftes während der IgG-Säulenpassage scheinen keine Rolle zu spielen, da bei Verwendung von schon mehrmals aufgepumpten Duodenalsaftes (Fraktion: Durchlauf + Spüllösung D; Abb. 2a) und frisch hergestellter IgG-Sepharose wieder die gleichen Mengen an HPaK (HPaK 4; Abb. 2b) gebunden wurden wie zu Beginn (HPaK 1; Abb. 2b).

Um sowohl Duodenalsaft als auch Säulenmaterial einzusparen, wurden sogenannte "Minisäulen" für die weiteren Versuche verwendet (siehe Kap. 2.2 Methoden). Bei den "Minisäulen" handelte es sich um mit IgG-Sepharose gefüllte Pasteur-Pipetten, deren Auslauf mit Glaswolle verschlossen wurde.

Zur Beantwortung der Frage, ob NaSCN das Säulenmaterial durch chemische Umsetzung verändert, wurde auf eine "Minisäule" dialysierter Harn, der als Ersatz für Duodenalsaft diente, wiederholt aufgepumpt und mit 4 mol/l NaSCN eluiert. Auch nach mehreren Zyklen wurde immer dieselbe Menge an Gewebs-Kallikrein gebunden und anschließend eluiert. Dies bedeutet, daß NaSCN keine chemische Umsetzung des Säulenmaterials bewirkt.

Erstaunlicherweise zeigte Säulenmaterial, das nach Gebrauch mehr als zwei Monate nicht verwendet worden war, nach dieser Zeit wieder die alte Ausgangsbindungskapazität. Somit kann ein proteolytischer Abbau der Antikörper ausgeschlossen werden.

Die Frage, ob unspezifische Wechselwirkungen die Ursache für die Abnahme der Bindungskapazität sein könnten, wurde versucht mit folgenden Untersuchungen zu beantworten. Sollten unspezifische Wechselwirkungen zwischen Säulenmaterial und Duodenalsaftbestandteilen die Ursache für die Bindungsabnahme sein, so könnten diese durch hohe Salzkonzentrationen, Detergentien oder organische Lösungsmittel aufgehoben werden.

Es wurde folgendermaßen vorgegangen: Unbenutzte IgG-Sepharose wurde mit Duodenalsaft beladen, mit Phosphatpuffer gespült und anschließend wurde das gebundene HPaK mit 4 mol/l NaSCN eluiert. Die Säule wurde dann mit unterschiedlichen Substanzen, die in Phosphatpuffer gelöst waren, äquilibriert. Der Durchlauf des Duodenalsaftes wurde nach der Äquilibrierung wieder aufgetragen, dann wurde mit Phosphatpuffer gespült und mit 4 mol/l NaSCN eluiert. Die erhaltene Aktivität diente als Maß der Bindungskapazität.

Folgende Lösungen wurden zur Verhinderung der postulierten unspezifischen Wechselwirkung verwendet:

2 mol/l NaCl
10 % Dioxan
0,1 % TX-100
5 ml Äthanol 96 %
4 mol/l Harnstoff
1 mol/l Benzamidiniumchlorid
Glycin/HCl 0,5 mol/l NaCl pH 2,5
4 mol/l NaSCN (Kontrolle)

Die Auswertung aller Versuche ergab übereinstimmend nur eine ca. 50 %ige Bindung im Vergleich zur Ausgangsbindung. Somit konnte eine unspezifische Wechselwirkung ausgeschlossen werden.

Die Überlegungen gingen nun dahin, das Problem durch "Vorschalten" eines anderen Chromatographieschrittes zu lösen, da durch Änderung der Versuchsbedingungen keine Verbesserung der Bindungskapazität erreicht werden konnte und eine plausible Erklärung dieses Phänomens augenblicklich nicht gegeben werden kann. In Anlehnung an die Arbeit von Figarella (16) wurde der Duodenalsaft zuerst über eine Sephadex G-100-Säule geschickt. Die AcPheArgOEt-spaltenden Fraktionen wurden vereint und dann auf eine IgG-Sepharose-Säule gepumpt; dabei wurde erstaunlicherweise keine Bindung an die IgG-Sepharose erhalten. Die Ursachen für diese Nichtbindung wurden nicht weiter untersucht, sondern ein weiterer Chromatographieschritt erprobt!

Bei der HUK-Isolierung wird im letzten Reinigungsschritt eine DEAE-Sepharose beschrieben (29). In Analogie wurde nun dialysierter Duodenalsaft zuerst auf eine DEAE-Sepharose-Säule gepumpt. Nach Ablösen der AcPheArgOEt-spaltenden Aktivität mit Hilfe eines NaCl-Gradienten erfolgte die Bindung an die IgG-Sepharose-Säule. Dabei war die Bindung der nach Ionenaustausch an DEAE-Sepharose erhaltenen HPaK-Fraktionen sehr gut reproduzierbar, ohne jeglichen Verlust an enzymatischer Aktivität. Dieser erfolgreiche Vorversuch wurde nun anschließend im Detail zu einer Isolierungsmethode für HPaK ausgearbeitet und optimiert (vgl. 4. Ergebnisse).

Nach den experimentellen Daten kann man vermuten, daß bei der Dialyse und anschließend beim Ionenaustausch an DEAE-Sepharose Substanzen abgetrennt werden, die die Bindung von HPaK an die IgG-Sepharose störend beeinflussen.

4. Ergebnisse

4.1 Isolierung

Die in Tabelle 2 angegebene Methode erwies sich als geeignet, um menschliches Pankreas-Kallikrein aus Duodenalsaft zu isolieren.

Anreicherungsschritt	Volumen (ml)	Gesamtprotein (mg)	Gesamtaktivität (AcPheArgOEt-U)	Spez. Aktivität (AcPheArgOEt-U/mg)	Anreicherung
Duodenalsaft (nach Zentrifugation)	200	31[a]	227,2	7,3	1
DEAE-Sepharose-Eluat	152	9,5[a]	155,8	16,4	2,3
IgG-Sepharose-Eluat	70	-[c]	75,8	-	-
Gelfiltration (Sephadex G-25)	66	0,0729[b]	72,9	1000	137

a: Proteinbestimmung nach Folin und Ciocalteau (18)
b: Proteinbestimmung mit Radioimmunoassay nach Fink und Güttel (17)
c: konnte wegen hoher NaSCN-Konzentration nicht bestimmt werden

Tab. 2 Anreicherungsschema von HPaK aus menschlichem Duodenalsaft

200 ml eingefrorener, menschlicher Duodenalsaft wurde mit 5 ml einer Inhibitor-Lösung (0,125 g SBTI, 0,125 g LBTI und 0,5 g NaN_3 in 5 ml H_2O) versetzt und unter leichtem Schütteln bei Raumtemperatur aufgetaut.

Anschließend wurde der Rohextrakt 3 h bei 4°C mit 35000 g zentrifugiert. Das Zentrifugat wurde verworfen, der Überstand wurde mit 2 mol/l H_3PO_4 von pH 8,7 auf pH 7,0 gebracht, 24 h gegen dest. Wasser und weitere 24 h gegen 0,1 mol/l Ammoniumformiat pH 7,0 dialysiert und zur Isolierung von menschlichem Pankreas-Kallikrein verwendet.

1. Schritt:

Nach der Dialyse wurde der Duodenalsaft auf eine gekühlte (4°C), mit 0,1 mol/l Ammoniumformiat (pH 7,0) äquilibrierte DEAE-Sepharose-Säule (2,1 x 10 cm; Fluß: 13,2 ml/h) gegeben und mit Puffer (0,1 mol/l Ammoniumformiat, pH 7,0) proteinfrei (E_{280} < 0,0005) gewaschen.

Die gesammelten Fraktionen des Durchlaufs wurden auf AcPhe-ArgOEt-spaltende Aktivität geprüft.

Die Elution des Kallikreins erfolgte mit einem linearen NaCl-Gradienten, von 0,0 bis 0,4 mol/l NaCl in 0,1 mol/l Ammoniumformiatpuffer, pH 7,0. Fraktionen von 3,3 ml wurden gesammelt. Radioimmunologisch nachweisbares Kallikrein wurde bei einem Puffergehalt zwischen 0,12 und 0,18 mol/l NaCl eluiert (Abb. 3). Die einzelnen Fraktionen wurden danach auf proteolytische Aktivität geprüft (Substrat: AcPheArgOEt).

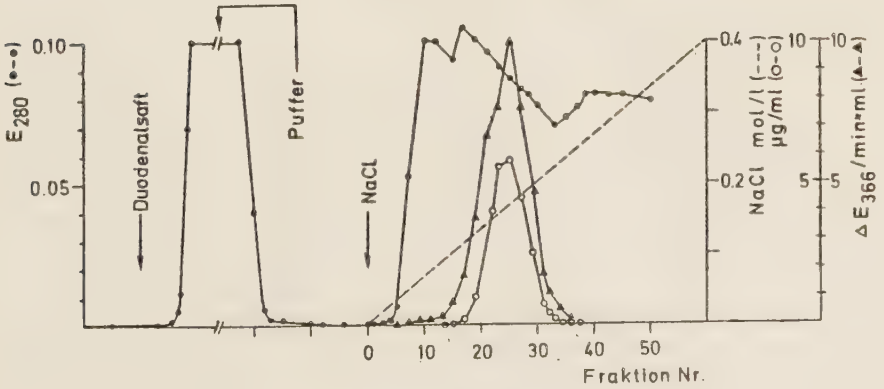

Abb. 3 Chromatographie von Duodenalsaft an DEAE-Sepharose, Kallikrein wurde radioimmunologisch (o) und enzymatisch (Substrat: AcPheArgOEt; ▲) bestimmt. Die Proteinkonzentration ist als Extinktion bei 280 nm (•) angegeben.

Nach Elution wurde die DEAE-Sepharose-Säule mit 0,1 mol/l Ammoniumformiat, 2 mol/l NaCl, pH 7,0, regeneriert und für weitere Isolierungen verwendet.

2. Schritt:

Die Kallikrein-enthaltenden Fraktionen wurden vereint und bei Raumtemperatur auf eine IgG-Sepharose-Säule (3,3 x 20 cm) gepumpt (Fluß: 25,2 ml/h), die über Nacht mit 0,025 mol/l Na_2HPO_4, 0,025 mol/l KH_2PO_4 und 1 mol/l NaCl Phosphatpuffer, pH 7,0, äquilibriert wurde. Danach wurde zehn Stunden mit demselben Phosphatpuffer gespült.

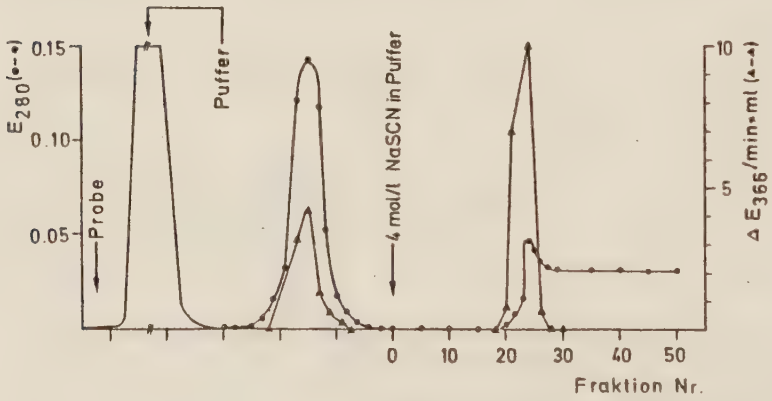

Abb. 4 Immunaffinitätschromatographie von menschlichem Pankreas-Kallikrein an HUK-spezifischer IgG-Sepharose. (▲) AcPheArgOEt-spaltende Aktivität; (●) Proteingehalt (E_{280}).

Der Durchlauf wurde auf AcPheArgOEt-spaltende Aktivität überprüft. Anschließend wurde menschliches Pankreas-Kallikrein mit 4 mol/l NaSCN abgelöst. Fraktionen von 6,3 ml wurden gesammelt (Abb. 4).

3. Schritt:

Zur Abtrennung von NaSCN wurden die Fraktionen vereint und ohne vorherige Dialyse auf eine Sephadex G-25-Säule (3 x 140 cm) aufgetragen (Fluß: 30 ml/h), die mit 0,1 mol/l Ammoniumformiat, pH 7,0, äquilibriert worden war. Fraktionen von 6,6 ml wurden gesammelt.

HPaK wurde radioimmunologisch und mittels AcPheArgOEt-spaltender Aktivität nachgewiesen, während NaSCN mit einer 2 mol/l $FeCl_3$-Lösung (100 µl pro Fraktion) optisch bestimmt wurde. Das gereinigte HPaK wurde bei -20°C gelagert.

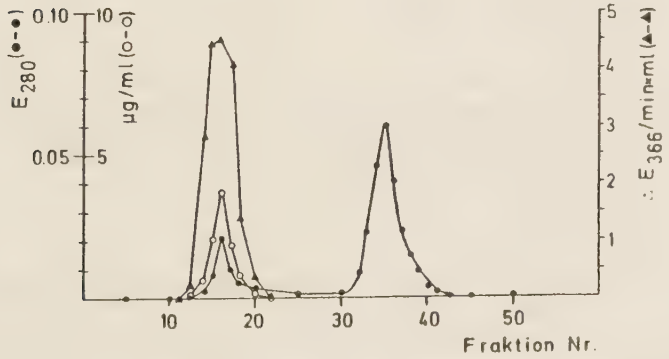

Abb. 5 Chromatographie von menschlichem Pankreas-Kallikrein an Sephadex G-25
Kallikrein wurde radioimmunologisch (o) und mittels AcPheArgOEt-spaltender Aktivität (▲) nachgewiesen; Extinktion bei 280 nm (●).

4.2 Charakterisierung

4.2.1 Chemische und physikochemische Eigenschaften

Molekulargewichtsbestimmung

Das Molekulargewicht von HPaK wurde mit Hilfe der Gelfiltration an Ultrogel AcA-44 und der SDS-Elektrophorese bestimmt.

Bei der Gelfiltration wurde für HPaK ein Molekulargewicht von ca. 40 000 erhalten. In der SDS-Elektrophorese wurde nach Vorinkubation mit SDS eine Proteinbande mit einem Molekulargewicht von 27 000 gefunden (Abb. 6).

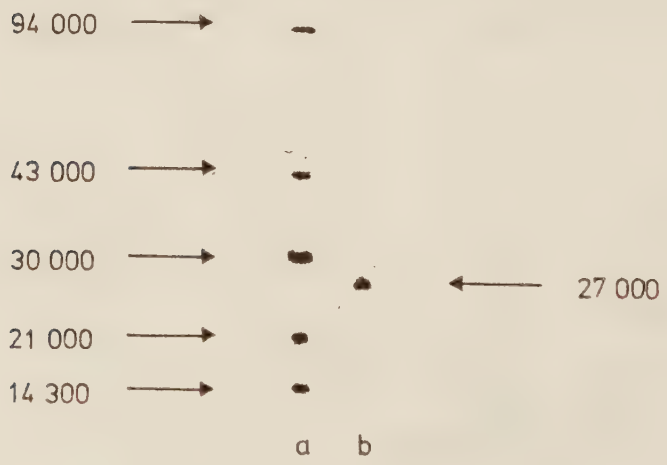

Abb. 6 SDS-Elektrophorese von HPaK (b) und einem Molekulargewichtsstandard (a).

Isoelektrische Fokussierung

Bei der isoelektrischen Fokussierung von HPaK wurden vier Proteinbanden mit isoelektrischen Punkten von 5,60, 5,65, 5,70 und 5,85 erhalten (Abb. 7).

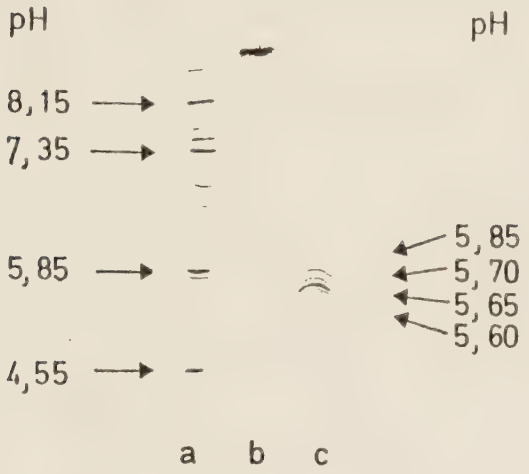

Abb. 7 Isoelektrische Fokussierung von HPaK (c), Cytochrom C (b) und einem Proteinstandard (a; Standard für die isoelektrische Fokussierung von Serva, Heidelberg).

Stabilität des Enzyms

HPaK ist bei -20°C mindestens sechs Monate ohne Aktivitätsverlust lagerbar. Auch mehrmaliges Auftauen innerhalb dieser Zeit hatte keinen Einfluß auf die Aktivität. Bei 4°C konnte das Material für mindestens einen Monat ohne Aktivitätsverlust aufbewahrt werden.

pH-Stabilität

Im sauren Bereich erfolgte eine relativ rasche Inaktivierung des HPaK (Abb. 8).

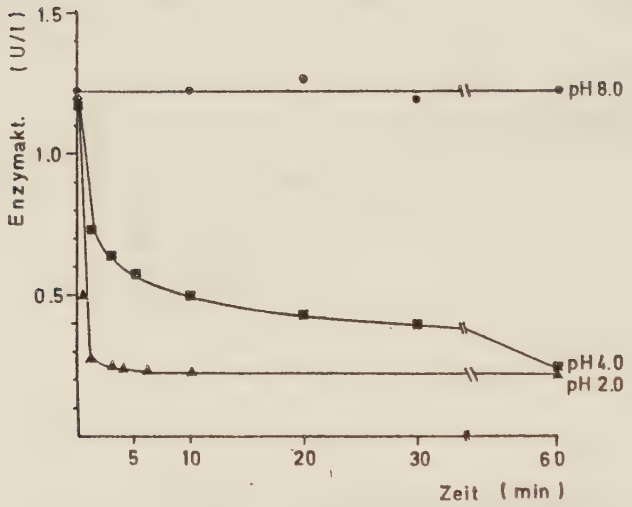

Abb. 8 Inaktivierung von HPaK bei saurem pH.
HPaK wurde bei pH 2,0, pH 4,0 und pH 8,0 unterschiedlich lang inkubiert und anschließend wurde die noch vorhandene enzymatische Aktivität (Substrat: AcPheArgOEt) bestimmt.

Temperaturstabilität

Bei der Inkubation von HPaK bei unterschiedlichen Temperaturen und anschließender Aktivitätsprüfung mittels Ac-PheArgOEt-Tests zeigte sich ab 56°C eine stetige Abnahme der Aktivität. Nach Zusatz von 0,1 % (w/v) Triton X-100 wurde eine Aktivitätszunahme (vgl. 4.2.3) verbunden mit einer verzögerten temperaturabhängigen Inaktivierung beobachtet (Abb. 9).

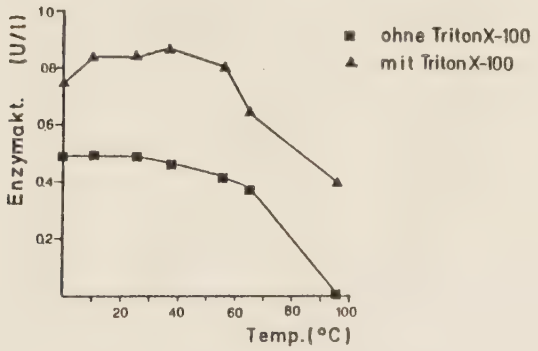

Abb. 9 Temperaturstabilität von HPaK mit und ohne Triton X-100.
HPaK wurde 15 min bei unterschiedlichen Temperaturen inkubiert und anschließend wurde die noch vorhandene Aktivität (Substrat: AcPheArgOEt) gemessen. Mit 0,1 % (w/v) Triton X-100 versetzte Proben wurden vor Versuchsbeginn erst 30 min bei 37°C vorinkubiert.

pH-Optimum

Die Spaltung von DValLeuArgNHNp durch HPaK erfolgt in einem relativ breiten pH-Bereich mit einem Optimum bei pH 10. Die Spaltung von CbzTyrONp zeigte dagegen ein relativ enges pH-Optimum, mit einem Maximum bei pH 8,5 (Abb. 10).

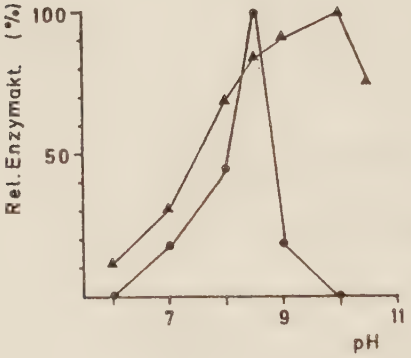

Abb. 10 pH-Optimum von HPaK
(▲) Spaltung von DValLeuArgNHNp (10 mU/Test);
(●) Spaltung von CbzTyrONp (10 mU/Test).

Aminosäurezusammensetzung

Die Aminosäurezusammensetzung des menschlichen Pankreas-Kallikreins wurde aus den Analysedaten von vier Bestimmungen erhalten (Tab. 3). Im Vergleich sind Harn-Kallikrein und Dickdarm-Kallikrein des Menschen, sowie Pankreas-Kallikrein vom Schwein dargestellt.

Aminosäurezusammensetzung

Aminosäure	menschliches Kallikrein aus			Schweine-pankreas-kallikrein
	Urin	Pankreas	Dickdarm	
Asp	23	23	23	28
Thr	14	14	14	15
Ser	14	14 - 18	14	14
Glu	28	25 - 28	28	23
Pro	14	14	13	16
Gly	22	22	22	22
Ala	14	14	(21)	13
Cys	10	n.b.	n.b.	10
Val	18	18	17 - 18	10
Met	4	4	4	4
Ile	8	8	8	12
Leu	20	17 - 20	20 - 21	20
Tyr	6	6	7	7
Phe	10	10	9 - 10	10
Lys	8	8	(15)	8
His	9	7 - 9	8	10
Arg	6	5 - 6	6 - 8	3
Trp	n.b.	n.b.	n.b.	7
gesamt	228	-	-	232

n.b. nicht bestimmt

Tab. 3 Aminosäurezusammensetzung von menschlichem Pankreas-Kallikrein im Vergleich zu Schweine-Pankreas-Kallikrein, Harn-Kallikrein und Dickdarm-Kallikrein vom Menschen.

Studien zur Aminosäuresequenz

HPaK wurde im Sequenator einem automatisierten Edman-Abbau unterworfen und die N-terminale Sequenz bis Position 4 ermittelt (Abb. 11).

Pankreas-Kallikrein (Mensch)	Ile-Val-Gly-Gly
Harn-Kallikrein (Mensch)	Ile-Val-Gly-Gly
Pankreas-Kallikrein (Schwein)	Ile-Ile-Gly-Gly
Konservierte Reste	Ile Val Gly Gly
Invariable Reste	Gly

Abb. 11 N-terminale Aminosäuresequenz von HPaK, HUK (40) und Schweine-Pankreas-Kallikrein (12).

4.2.2 Enzymatische Eigenschaften

Spezifische Aktivitäten

Im Hundeblutdrucktest (22) wurde für HPaK eine spezifische Aktivität von 1310 KE/mg Protein ermittelt. Für die Freisetzung von Kininen aus HMW-Kininogen wurden 0,361 Kininogen-U/mg, was einer Freisetzung von 0,383 μg Bradykininäquivalenten x mg^{-1} x min^{-1} entspricht, bestimmt.

Kinetische Daten

Die kinetischen Konstanten K_m und V_{max} der Spaltung von AcPheArgOEt und DValLeuArgNHNp durch HPaK sind in Tab. 4 zusammengefaßt. Die Werte wurden nach der Methode von Wilkinson (50) bestimmt.

Substrat	Pankreas-Kallikrein (Mensch) K_m (mol/l)	Pankreas-Kallikrein (Mensch) V_{max} (μmol x min^{-1} x mg^{-1})	Harn-Kallikrein (Mensch) K_m (mol/l)	Harn-Kallikrein (Mensch) V_{max} (μmol x min^{-1} x mg^{-1})
AcPheArgOEt	0.61×10^{-4}	1060	$0.6 \pm 0.1 \times 10^{-4}$	1100 ± 24
DValLeuArgNHNp	0.21×10^{-4}	10.4	$0.24 \pm 0.03 \times 10^{-4}$	5.67 ± 0.12

Tab. 4 Kinetische Daten der Spaltung synthetischer Substrate durch HPaK und HUK (29).

Hemmstudien

Die bimolekulare Geschwindigkeitskonstante der Inaktivierung von HPaK durch DFP wurde bei pH 7,2 und 25°C zu 10,5 l/mol x min bestimmt.

Hemmkonstanten der Inaktivierung durch DFP (pH 7,2; 25°C)		l x mol^{-1} x min^{-1}
Kallikrein		
Harn (Mensch)[a]	9 ± 2	
Dickdarm (Mensch)[b]	4	
Pankreas (Mensch)	10,5	
Plasma, glanduläres (Mensch)[c]	1,1	
Plasma (Mensch)	320 ± 20	
Pankreas (Schwein)[d]	8 ± 1	
Trypsin[e]	300	
Chymotrypsin[e]	2 700	
Acetylcholinesterase[e]	13 000	

a: Geiger (29) b: Zimmermann (52)
c: Geiger (32) d: Fiedler (11)
e: Fahrney (10)

Tab. 5 Geschwindigkeitskonstante der DFP-Hemmung verschiedener Serinproteasen (pH 7,2; 25°C).

Aus der Hemmkurve, die durch Titration von HPaK mit Aprotinin erhalten wurde (Abb. 12), konnte eine Dissoziationskonstante K_i von 1,5 x 10^{-10} mol/l für den HPaK-Aprotinin-Komplex nach Green und Work (33) berechnet werden.

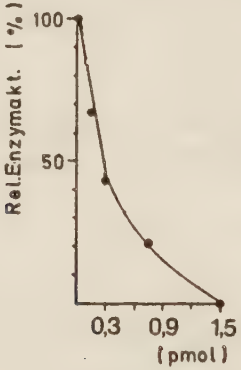

Abb. 12 Titration von HPaK mit Aprotinin
Testbedingungen: 10 mU Enzym/Test;
spez. Aktivität: 1000 U/mg; Substrat: AcPheArgOEt

Sowohl für Benzamidiniumchlorid, als auch SBTI konnte keine Hemmung des HPaK beobachtet werden (Abb. 13).

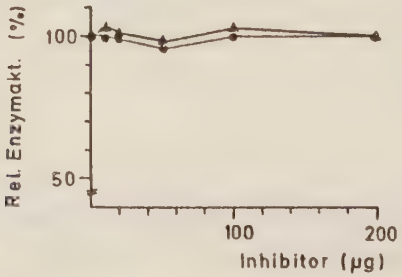

Abb. 13 Titration von HPaK mit Benzamidiniumchlorid und SBTI
Testbedingungen: 10 mU Enzym/Test;
spez. Aktivität: 1000 U/mg; Substrat: AcPheArgOEt

4.2.3 Hydrophobe Wechselwirkung

Beeinflussung der HPaK-Aktivität durch Detergenzien

Die HPaK-katalysierte Spaltung von AcPheArgOEt wurde durch Zugabe von Detergenzien, Humanserumalbumin und Lysolezithin erhöht (Abb. 14).

Detergenz	% Aktivität
Kontrolle	100
Triton X-100	223
Tween-20	223
menschliches Serumalbumin	206
Lysolezithin	206

Abb. 14 Aktivierung von HPaK
Testbedingungen: 10 mU Enzym/Test;
Substrat: AcPheArgOEt;
spez. Aktivität: 1000 U/mg;
Konzentration der verwendeten Substanzen: 0,1 % (w/v).

Die beobachtete Aktivierung von HPaK durch Detergenzien ist von der Konzentration des Detergenz abhängig (Abb. 15). Ferner wurde festgestellt, daß die Stimulierbarkeit der AcPheArgOEt-spaltenden Aktivität vom Alter der HPaK-Lösung abhängig ist (Abb. 15).

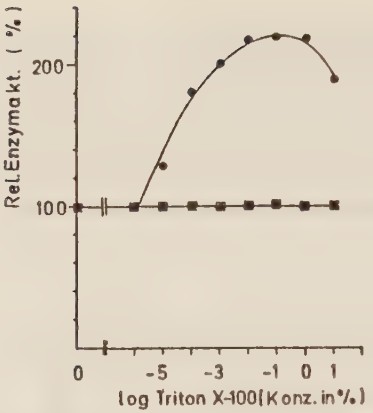

Abb. 15 Stimulierbarkeit der HPaK-Aktivität in Abhängigkeit der Triton X-100-Konzentration.
(●) frisch isolierte HPaK-Präparation;
(■) HPaK-Präparation nach 4 Wochen Lagerung bei 4°C; 10 mU/Test;
spez. Aktivität: 1000 U/mg; Substrat: AcPheArgOEt

Nach Zugabe von 0,1% (w/v) Triton X-100 wurde die Hemmwirkung von Aprotinin gegenüber HPaK herabgesetzt (Abb. 16).

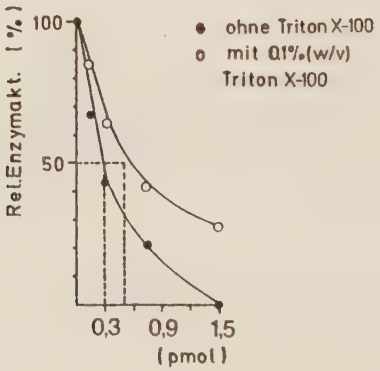

Abb. 16 Titration von HPaK mit Aprotinin ohne Triton X-100 und mit 0,1% (w/v) Triton X-100.

Wechselwirkung von HPaK mit Phenyl- und Octyl-Sepharose

Chromatographie an Phenyl-Sepharose:

220 µl HPaK mit einer Aktivität von 400 mU (Substrat: Ac-PheArgOEt) wurde auf eine mit 4 mol/l NaCl, 0,05 mol/l Natrium-Phosphatpuffer, pH 7,0, äquilibrierten Phenyl-Sepharose-Säule (10 x 0,8 cm) gegeben (Fluß: 10,5 ml/h). Die Ablösung des gebundenen Kallikreins erfolgte mit einem NaCl-freien 0,05 mol/l Natrium-Phosphatpuffer, pH 7,0 (Abb. 17).

Die HPaK-Aktivität betrug in den eluierten, vereinigten Fraktionen 420 mU.

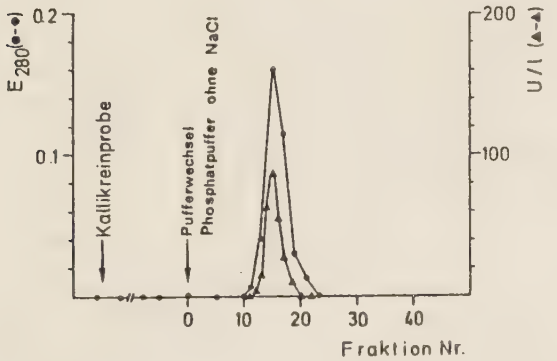

Abb. 17 Chromatographie von HPaK an Phenyl-Sepharose.
(●) E_{280}
(▲) HPaK-Aktivität (Substrat: AcPheArgOEt).

Chromatographie an Octyl-Sepharose:

220 µl HPaK-Lösung mit einer Aktivität von 400 mU wurde auf eine Octyl-Sepharose-Säule (10 x 0,8 cm) aufgetragen (Fluß: 10,5 ml/h), die mit 4 mol/l NaCl in 0,5 mol/l Natrium-Phosphatpuffer, pH 7,0, äquilibriert worden war. Die Ablösung des gebundenen Kallikreins erfolgte mit 0,05 mol/l Phosphatpuffer, pH 7,0, der 0,1 % (w/v) Triton X-100 enthielt (Abb. 18).

Die Aktivität betrug nach Ablösen in den vereinigten Fraktionen 383 mU.

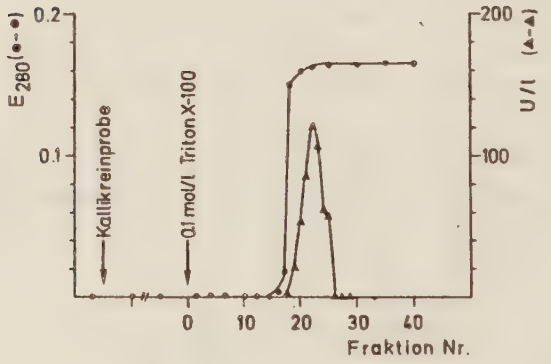

Abb. 18 Chromatographie von HPaK an Octyl-Sepharose.
(●) E_{280};
(▲) HPaK-Aktivität (Substrat: AcPheArgOEt).

5. Diskussion

Die in den Voruntersuchungen gemachten Erfahrungen bei der Isolierung von HPaK aus menschlichem Duodenalsaft wurden bei der Ausarbeitung des beschriebenen Isolierungsverfahrens berücksichtigt. Dieses optimierte Isolierungsverfahren lieferte in wenigen Schritten reines HPaK in einer Ausbeute von 32%. Um einen Abbau des HPaK durch proteolytische Enzyme des Duodenalsaftes zu verhindern, wurde LBTI und SBTI, die Gewebs-Kallikreine nicht hemmen (24), dem tiefgefrorenen Duodenalsaft zugegeben. Durch leichtes Schütteln des gefrorenen Duodenalsaftes mit der Inhibitor-Lösung war beim Auftauen eine gleichmäßige Durchmischung gewährleistet. Durch Zugabe von Natriumazid wurde ferner bakterielles Wachstum verhindert.

Bei der weiteren Aufbereitung des Duodenalsaftes konnten mit Hilfe der Zentrifugation Trübungen und Schwebeteilchen vollständig abgetrennt werden. Eine nachfolgend durchgeführte Dialyse (24 h gegen Aqua dest. und 24 h gegen 0,1 mol/l Ammoniumformiat pH 7,0) setzte die Leitfähigkeit des Duodenalsaftes von $4{,}7 \times 10^{-4}$ Siemens auf $0{,}2 \times 10^{-4}$ Siemens herab und glich dabei die Leitfähigkeit an den DEAE-Sepharose-Säulen-Puffer an.

Nach Ionenaustausch-Chromatographie des vorbehandelten Duodenalsaftes an DEAE-Sepharose wurden die eluierten Fraktionen mit BzArgNHNp und AcPheArgOEt auf Trypsin bzw. Kallikrein-Aktivität hin überprüft. Dabei konnte mit dem bevorzugt von Trypsin gespaltenen Substrat BzArgNHNp keinerlei Aktivität nachgewiesen werden, was auf eine Inaktivierung des Trypsins durch die zugesetzten Inhibitoren hindeutet. Das Vorhandensein geringer Trypsinspuren, die mit diesen synthetischen Substraten nicht mehr nachgewiesen werden können, kann jedoch an dieser Stelle nicht ganz ausgeschlossen werden (vgl. Diskussion über multiple Formen). Kallikrein-Aktivität, die

mit der Spaltung des Substrates AcPheArgOEt und mit dem Radioimmunoassay für menschliches Harn-Kallikrein nachgewiesen wurde, konnte in den Fraktionen mit einer NaCl-Konzentration von 0,12 bis 0,22 mol/l nachgewiesen werden.

Im nächsten Reinigungsschritt konnte das menschliche Pankreas-Kallikrein mit Hilfe der Immunaffinitätschromatographie an Anti-HUK-IgG-Sepharose von weiteren Begleitproteinen vollständig abgetrennt werden. Um dies zu erreichen mußte die Anti-HUK-IgG-Sepharose überdurchschnittlich lang mit Ausgangspuffer gespült werden. Danach erfolgte die Ablösung des Kallikreins mit 4 mol/l Natriumthiocyanat. Nach anschließender Gelfiltration an Sephadex G-25 wurde das Natriumthiocyanat quantitativ von HPaK abgetrennt.

Die Einheitlichkeit des Enzyms wurde durch folgende Untersuchungen belegt:

1. Nach Auftragen der HPaK-Präparation war in der hochauflösenden SDS-Elektrophorese nur eine Proteinbande nachweisbar.
2. Bei der Analyse von HPaK im Sequenator mittels automatischen Edman-Abbau konnte die N-terminale Sequenz eindeutig bestimmt werden.

Als Identitätsnachweis, daß die erhaltenen Präparationen authentisch Kallikrein darstellen, dienen folgende Beobachtungen:

1. Die Fähigkeit geringer Mengen des Enzyms nach i.v. Injektion den mittleren arteriellen Blutdruck des Hundes abzusenken;
2. die Fähigkeit aus menschlichem HMW-Kininogen Kinin freizusetzen;
3. die starke Hemmung durch Aprotinin und die fehlende Inhibierung durch SBTI, was für Gewebs-Kallikreine typisch ist;
4. die durch DFP bewirkte Inaktivierungsgeschwindigkeit, die 30 bis 1000 mal geringer ist, als die für andere

Serinproteasen. Diese langsame Inaktivierung durch DFP scheint für alle Gewebs-Kallikreine charakteristisch zu sein.

5. Die auffallende Ähnlichkeit der Aminosäuresequenz mit der des Schweine-Pankreas-Kallikrein und des menschlichen Harn-Kallikrein.

Menschliches Pankreas-Kallikrein ist ein recht stabiles Enzym. Es ist mindestens sechs Monate bei -20°C ohne Aktivitätsverlust lagerbar. Auch mehrmaliges Auftauen innerhalb dieser Zeit hatte keinen Einfluß auf die Aktivität. Bei 4°C konnte das Material für mindestens einen Monat ohne Aktivitätsverlust aufbewahrt werden. In Lösungen von pH 4 erfolgte eine langsame Inaktivierung, wogegen bei pH 2 eine sofortige Inaktivierung zu beobachten war. Die Inaktivierung im sauren Milieu dürfte auf eine Denaturierung zurückzuführen sein.

Werden HPaK-Lösungen unterschiedlichen Temperaturen ausgesetzt, so findet man ab 56°C eine Aktivitätsabnahme, was auch auf Denaturierungsvorgänge zurückzuführen ist.

Chemische und physikochemische Eigenschaften

Das Molekulargewicht von HPaK wurde mittels Gelfiltration zu 40000 bestimmt. Bei der SDS-Elektrophorese ergab sich dagegen ein Molekulargewicht um 27000. Ähnlich wie beim Schweine-Pankreas-Kallikrein beobachtet, ergeben sich bei der Gelfiltration höhere Molekulargewichte als bei der SDS-Elektrophorese. Diese Unterschiede sind auf den Zuckeranteil der Kallikreine zurückzuführen, da Glykoproteine im allgemeinen dazu neigen, bei der Abschätzung des Molekulargewichtes mit Hilfe der Gelfiltration zu hohe Werte zu ergeben (2).

Auf den unterschiedlichen Kohlehydratanteil sind auch die Mikroheterogenitäten (4 Banden), die bei der isoelektrischen Fokussierung beobachtet wurden, zurückzuführen. Hervorzuheben ist in diesem Zusammenhang, daß die isoelektrischen Punkte von HPaK (5,60, 5,65, 5,70 und 5,85) näher am alkalischen Bereich liegen als die von menschlichem Gewebs-Kallikrein aus Harn (3,75, 3,80, 3,90, 4,00 und 4,05) und Schweine-Pankreas-Kallikrein (3,64, 3,71, 3,85, 3,95 und 4,05).

Durch Zusatz von DTT und Vorinkubation bei 100°C für zwei Minuten erfolgte eine Auflösung der in der SDS-Elektrophorese beobachteten Bande. Dies läßt den Schluß zu, daß das aus menschlichem Duodenalsaft isolierte Gewebs-Kallikrein nicht einkettig (wie z.B. HUK) vorliegt, sondern wie das aus autolysiertem Pankreasgewebe isolierte Pankreas-Kallikrein des Schweines ebenfalls aus mehreren Ketten (β- oder γ-Kallikrein), die über Disulfidbrücken zusammenhängen, besteht. Dies ist nicht verwunderlich, da während der ersten Isolierungsschritte genügend Zeit vorhanden ist, in der selbst Spuren von Proteinasen aktiv werden können. Dazu ist noch zu bemerken, daß beim Edman-Abbau N-terminal neben Isoleucin noch Alanin, das höchstwahrscheinlich die N-terminale Aminosäure der zweiten Kette darstellt, gefunden wurde, wobei dies nicht auf kleine Verunreinigungen zurückzuführen ist. Dies steht in voller Übereinstimmung mit den an Pankreas-Kallikrein des Schweines gewonnenen Daten (12).

Die gute Übereinstimmung des Molekulargewichtes menschlichen Pankreas-Kallikreins mit anderen Gewebs-Kallikreinen des Menschen und des Schweines läßt vermuten, daß auch für andere Eigenschaften Ähnlichkeiten zu erwarten sind. In der Tat stimmen die Aminosäurezusammensetzung von HPaK und HUK überein und auch die bisher sequenzierten Bereiche sind gleich. Wie bei den meisten aktiven Serinproteasen beginnt auch die N-terminale Sequenz des HPaK mit Ile-Val-Gly-Gly.

Enzymatische Eigenschaften

Wie das menschliche Harn-Kallikrein, so besitzt auch das Pankreas-Kallikrein des Menschen ein Aktivitätsmaximum bei pH 8-9; für DValLeuArgNHNp liegt das Aktivitätsmaximum bei pH 10.

Im Hundeblutdrucktest ergab sich für das menschliche Pankreas-Kallikrein ein Wert von 1310 KE/mg (HUK = 2300 KE/mg (29)). Im Rattenuterustest nach Freisetzung von Kallidin aus menschlichem HMW-Kininogen wurden 0,36 HMW-Kininogen-U/mg gemessen (HUK = 0,742 HMW-Kininogen-U/mg (29)).

Die Spaltung synthetischer Substrate ergab für menschliches Pankreas-Kallikrein Werte von K_m = 0,61 x 10^{-4} mol/l, V_{max} = 1060 µmol/mg·min (AcPheArgOEt); für DValLeuArgNHNp wurde K_m zu 0,21 x 10^{-4} mol/l und V_{max} zu 10,4 µmol/mg·min bestimmt. Dies steht in guter Übereinstimmung mit den Werten, die für andere menschliche Gewebs-Kallikreine (HUK) bestimmt wurden (29). Die durch DFP bewirkte Inaktivierungsgeschwindigkeit des HPaK (10,5 l/mol·min) ist den für menschliches Harn-Kallikrein (9 ± 2 l/mol·min (29)) und Schweine-Pankreas-Kallikrein (8 ± 1 l/mol·min (11)) sehr ähnlich. Im Vergleich zu anderen Serinproteasen, wie Trypsin, Chymotrypsin und Acetylcholinesterase, unterscheiden sich die Hemmkonstanten um den Faktor 30 - 1000 (10, 11, 29, 32, 52). Die niedrige Konstante der Hemmung der Gewebs-Kallikreine durch DFP scheint für Gewebs-Kallikreine ein Charakteristikum zu sein.

Die Dissoziationskonstante für den HPaK-Aprotinin-Komplex wurde zu 1,5 x 10^{-10} mol/l bestimmt (HUK : 0,9 x 10^{-10} mol/l (29); Schweine-Pankreas-Kallikrein : 0,8 x 10^{-9} mol/l (5)). Der für die Dissoziation des menschlichen Plasma-Kallikrein-Aprotinin-Komplexes gemessene Wert liegt dagegen bei 1 x 10^{-7} mol/l (26).

Hydrophobe Wechselwirkung

Durch Zugabe von Detergenzien (Abb. 14) nimmt die Aktivität des HPaK gegenüber synthetischen Substraten zu. Auch mit menschlichem Serumalbumin erhält man eine vergleichbare Aktivitätszunahme. Bei unterschiedlicher Triton X-100-Konzentration im Reaktionsansatz ergibt sich ein breites Aktivitätsmaximum von 0,01 bis 1 % (w/v) Triton X-100. Nach Lagerung der Kallikrein-Lösung (4°C, 4 Wochen) kann eine Aktivierung der Präparate durch Detergenzien nicht mehr beobachtet werden. Wird bei der Hemmung von menschlichem Pankreas-Kallikrein mit Aprotinin das Enzym vorher mit Triton X-100 vorinkubiert, so erfolgt die Inaktivierung langsamer. Bei der temperaturabhängigen Inaktivierung zeigt sich, daß durch Vorinkubation von Pankreas-Kallikrein mit Triton X-100 eine Parallelverschiebung der Inaktivierungskurve erfolgt. Eine befriedigende Erklärung dieser Phänomene kann im Moment nicht gegeben werden, doch könnten Konformationsänderungen des HPaK, die durch Detergenzien induziert werden, dafür verantwortlich sein.

Ferner konnte menschliches Pankreas-Kallikrein auch an hydrophobe Träger, wie Octyl- und Phenyl-Sepharose gebunden werden. Nach Absorption des Enzyms an den Träger konnte es mit NaCl-freiem Puffer wieder abgelöst werden. Interessanterweise konnte eine Elution des an Octyl-Sepharose gebundenen HPaK erst mit 0,1 % (w/v) Triton X-100 erfolgen. Dies deutet auf eine bedeutend intensivere Wechselwirkung von HPaK mit Octyl-Sepharose hin. Diese Eigenschaft des HPaK, mit hydrophoben Agentien in Wechselwirkung treten zu können, wurde auch für andere Serinproteasen wie HUK (29), Ratten-Harn-Kallikrein (4) und Eber-Akrosin (44) beobachtet, nicht jedoch für Schweine-Pankreas-Kallikrein (27).

Die auch bei HPaK beobachtete starke Wechselwirkung mit Amphiphilen läßt vermuten, daß HPaK eine für membranassoziierte Proteine charakteristische Eigenschaft (3) besitzt. Die Eigenschaft von Proteinen sich bevorzugt an Membranen zu asso-

ziieren setzt relativ exponierte hydrophobe Bezirke voraus. Diese hydrophoben Bezirke können durch die intensive Wechselwirkung von HPaK mit Octyl- und Phenyl-Sepharose bestätigt werden. Interessanterweise zeigt Schweine-Pankreas-Kallikrein diese Eigenschaft nicht. Dies kann auf spezies-spezifische Unterschiede hinweisen.

Resultate anderer Autoren

Bis heute sind nur wenige Daten über das menschliche Pankreas-Kallikrein bekannt (16, 43). Zwar wurden Methoden beschrieben HPaK zu isolieren, aber eine detaillierte Charakterisierung fehlte. Von Moriya wurde ein Molekulargewicht von 31200 (43) für HPaK angegeben, das durch Sedimentationsgleichgewichtsstudien gewonnen wurde. Das Material wurde aus Pankreasgewebe isoliert, wobei aber keine Inhibitoren als autoproteolytischer Schutz zugesetzt wurden. Über die Enzymformen, α-, β- und γ-Kallikrein, kann deshalb keine Aussage gemacht werden.

Von Figarella (16) wurde über eine Isolierung von HPaK aus Pankreassaft berichtet. Die in Anlehnung an diese Studien durchgeführten Vorversuche konnten die beschriebenen Ergebnisse nicht bestätigen. Eine enzymatische Charakterisierung wurde auch hier nicht durchgeführt.

Ausblick

Analog zum Schweine-Pankreas-Kallikrein (14) kann man versuchen natives menschliches Pankreas-Kallikrein (α-Kallikrein) zu isolieren. Durch direktes Absaugen des Pankreassaftes an der Papilla duodeni und gleichzeitigen Schutz vor proteolytischem Abbau (Inhibitoren) sollte dies zu erreichen sein.

Insgesamt konnten bisher ca 1 mg HPaK isoliert werden. Für weitere Untersuchungen, z.B. Sequenzstudien, werden größere Mengen benötigt. Um dies zu bewerkstelligen, können folgende Verbesserungen vorgeschlagen werden:

1. Man muß die Zahl der an CNBr-Sepharose gebundenen spezifischen Anti-HUK-IgG's erhöhen. Dazu benötigt man größere Mengen reines menschliches Gewebs-Kallikrein (Harn). Letzteres wird zum einen für die Antikörpergewinnung verwendet, zum anderen direkt an CNBr-Sepharose gebunden, um damit spezifische Anti-HUK-IgG's aus der gewonnenen Antikörperfraktion anzureichern, die wie oben beschrieben an die CNBr-Sepharose gebunden werden.

2. Statt das Material vom Anionenaustauscher einer Säulenchromatographie zuzuführen, könnte man hier zur Zeitersparnis das Batch-Verfahren mit IgG-Sepharose anwenden.
   Vorversuche in dieser Richtung wurden gemacht, wobei aber die genauen Versuchsbedingungen (vor allem Zentrifugation der IgG-Sepharose) noch eruiert werden müssen.

Diese beiden noch ausstehenden Verbesserungen könnten es ermöglichen, in relativ kurzer Zeit große Mengen HPaK zu isolieren, um damit Sequenzstudien durchzuführen.

Literaturverzeichnis

1. Abelous, J. E. und Bardier, E. (1909) Les Substances Hypertensive de l'Urine Humaine Normale. Compt. Rend. Soc. Biol. 66, 511 - 512

2. Andrews, P. (1970) Meth. Biochem. Anal. 18, 1

3. Capaldi, R. A. (ed.), (1977) Membrane Proteins and their Interactions with Lipids. M. Dekker, Inc. New York

4. Chao, J., (1978) Activity and Structural Changes of Purified Kallikrein with Detergent Treatment. Arch. Biochem. Biophys. 185, 549 - 556

5. Dietl, T., Dobrinski, W. und Hochstraßer, K. (1979 b) Human Inter- -Trypsin Inhibitor. Limited Proteolysis by Trypsin, Plasmin, Kallikrein and Granulocyte Elastase and Inhibitory Properties of the Cleavage Products. Hoppe Seyler's Z. Physiol. Chem. 360, 1313 - 1318

6. Edman, P. und Henschen, A. (1975) Sequence Determination. In: Protein Sequence Determination (Needleman, S. B., ed.) 2. Aufl., ff. 232 - 279. Springer Verlag Berlin

7. Erdös, E. G. und Wilde, A. F., edd. (1970) Bradykinin, Kallidin und Kallikrein. Handb. Exp. Pharm. 25, Suppl. 1 Springer Verlag, Berlin

8. Erdös, E. G., ed. (1979 a) Bradykinin, Kallidin und Kallikrein. Handbuch der Experimentellen Pharmakologie 25, Suppl. 1, Springer Verlag, Berlin

9. Erdös, E. G., (1979 b) Kininases. In: Handbuch der Experimentellen Pharmakologie 25 Suppl. (Erdös, E. G., ed.) ff. 428 - 488, Springer Verlag, Berlin

10. Fahrney, D. E. und Gold, A. M. (1963) Sulfonyl Fluorides as Inhibitors of Esterases. I. Rates of Reaction with Acetylcholinesterase, α-Chymotrypsin and Trypsin. J. Amer. Chem. Soc. 85, 997 - 1000

11. Fiedler, F., Müller, W. und E. Werle (1969) The Inhibition of Procine Pancras Kallikrein by Di-Isopropyl-Fluorphosphate. Eur. J. Biochem. 10, 419 - 425

12. Fiedler, F., Ehret, W., Godex, G., Hirschauer, C., Kutzbach, C., Schmidt-Kastner, G. und Tschesche, H. (1977) The Primary Structur of Pig Pancreatic Kallikrein B. In: Kininogenases - Kallikrein 4 (Haberland, G. L., Rohen, J. W. und Suzuki, T., edd.) ff. 7 - 14, Schattauer Verlag, Stuttgart

13. Fiedler, F., Geiger, R., Hirschauer, C. und Leysath, G. (1978) Peptide Esters and Nitroanilides as Substrates for the Assay of Human Urinary Kallikrein. Hoppe Seyler's Z. Physiol. Chem. 259, 1667 - 1673

14. Fiedler, F. und Gebhard, W. (1980) Isolation and Characterization of Native Single-Chain Porcine Pancreatic Kallikrein Another Possible Precursor of Urinary Kallikrein. Hoppe Seyler's Z. Physiol. Chem. 361, 1661 - 1671

15. Fiedler, F., Fink, E., Tschesche, H. und Fritz, H. (1981 a) Porcine Glandular Kallikreins. Meth. Enzymol., im Druck

16. Figarella, C., Amouric, M., (1979) Characterization and Purification of a Kallikrein from Human Pancreatic Juice and Immunological Comparison with other Kallikreins Hoppe Seyler's Z. Physiol. Chem. 360, 457 - 465

17. Fink, E. und Güttel, C. (1978 b) Development of a Radioimmunoassay for Pig Pancreatic Kallikrein. J. Clin. Chem. Clin. Biochem. 16, 381 - 385

18. Folin, O. und Ciocalteau, V. (1927) On Tyrosine and Tryptophane Determinations in Proteins. J. Biol. Chem. 73, 627 - 650

19. Frey, E. K. (1926) Zusammenhänge zwischen Herzarbeit und Nierentätigkeit. Arch. Klin. Chir. 142, 663 - 669

20. Frey, E. K., Kraut, H. und Schultz, F. (1930) Über eine innersekretorische Funktion des Pankreas. Arch. Exp. Path. Pharmakol. 158, 334 - 347

21. Frey, E. K., Kraut, H. und Werle, E. (1968 a) In: Das Kallikrein-Kinin-System und seine Inhibitoren. Ferdinand Enke Verlag, Stuttgart, ff. 82

22. Frey, E. K., Kraut, H. und Werle, E. (1968 b) Bestimmungsmethoden für Kallikrein. In: Das Kallikrein-Kinin-System und seine Inhibitoren. Ferdinand Enke Verlag, Stuttgart, ff. 11

23. Fritz, H., Eckert, I. und Werle, E. (1967 b) Isolierung und Charakterisierung von sialinsäurehaltigem und sialinsäurefreiem Kallikrein aus Schweinepankreas. Hoppe Seyler's Z. Physiol. Chem. 348, 1120 - 1132

24. Fritz, H., Trautschold, I. und Werle, E. (1974) Trypsin- und Plasmin-Inhibitoren. In: Methoden der enzymatischen Analyse (Bergmeyer, H. U., ed.) 3. Aufl., Verlag Chemie, Weinheim, Bergstr., 1108 - 1116

25. Fritz, H., Fiedler, F., Dietl, T., Warwas, M., Truscheit, E., Kolb, H. J., Mair, G. und Tschesche, H. (1977) On the Relationship Between Porcine Pancreatic, Submandibular and Urinary Kallikreins. In: Kininogenases - Kallikrein 4 (Haberland, G. L., Rohen, J. W. und Suzuki, T., edd.) ff. 15 - 28 Schattauer Verlag, Stuttgart

26. Fritz, H. (1978 a) Inhibition of Plasmin and Plasma Kallikrein by the Basic Trypsin-Kallikrein Inhibitor from Bovine Organs (Trasylol^{R}) and Similar Proteinase Inhibitors Theoretical Considerations. Proc. Chem. Fibrinol. Thromb. 3, 285 - 290

27. Fritz, H. und Förg-Brey, B. (1978 b) persönliche Mitteilung

28. Geiger, R., Stuckstedte, U., Förg-Brey, B. und Fink, E. (1979) Human Urinary Kallikrein - Biochemical and Physiological Aspects. Adv. Exp. Med. Biol. 120 A, 235 - 244

29. Geiger, R., Stuckstedte, U. und Fritz, H. (1980 a) Isolation and Characterization of Human Urinary Kallikrein. Hoppe Seyler's Z. Physiol. Chem. 361, 1003 - 1016

30. Geiger, R. und Fritz, H. (1981 b) Human Urinary Kallikrein. Meth. Enzymol. 80, Proteolytic Enzymes, Part C, im Druck

31. Geiger, R. and B. Clausnitzer (1981) Isolation of an enzymatically active tissue kallikrein from human seminal plasma by immunoaffinity chromatography. Hoppe Seyler's Z. Physiol. Chem. 362, 1279 - 1283

32. Geiger, R., Clausnitzer, B., Fink, E., and H. Fritz (1980 b) Isolation of an enzymatically active glandular kallikrein from human plasma by immunoaffinity chromatography. Hoppe Seyler's Z. Physiol. Chem. 361, 1795 - 1803

33. Green, N. M. und Work, E. (1952) Pancreatic Trypsin Inhibitor. Reaction with Trypsin. Biochem. J. 54, 347 - 352

34. Haddy, F. J., Emerson, T. E., Scott, J. B. und Daugherty Jr., R. M. (1970) The Effect of Kinins on the Cardiovaskular System. In: Handb. Exp. Pharm. 25, (Erdös, E. G., Wilde, A. F., edd.) ff. 362 - 384, Springer Verlag, Berlin

35. Hamberg, U. (1978 a) Current and Past Nomenclature of the Kininogen-Kinin-System. Agents and Actions 8, 165 - 166

36. Henschen, A. und Lottspeich, F. (1980) Aspects on Automated and Microcale Sequencing. In: Methods in Peptide and Protein Sequence Analysis (Birr, C., ed.) ff. 105 - 114, Elsevier/North-Holland, Amsterdam

37. Hermodson, M. A., Ericson, L. H., Neurath, H. und Walsh, K. A., (1973) Determination of the Amino Acid Sequence of Porcine Trypsin by Sequenator Analysis. Biochem. 12, 3146 - 3153

38. Jörg, Pastel, Westermeier, Jianassia und Righetti (1980) SDS Gradienten Gel-Elektrophorese J. Biochem. Biophys. Meth 3 273 - 284

39. Kato, H., Han, N., Iwanaga, S., Hashimoto, N., Sugo, T., Fuji, S. und Suzuki, T. (1977 a) Mammalian Plasma Kininogens: their Structure and Functions. In: Kininogenases 4 (Haberland, G. L., Rohen, J. W., Suzuki, T., edd.) ff. 63 - 72 Schattauer Verlag, Berlin

40. Lottspeich, F., Geiger, R., Henschen, A. und Kutzbach, C. (1979) N-terminal Amino Acid Sequence of Human Urinary Kallikrein Homology with Other Serine Proteases. Hoppe Seyler's Z. Physiol. Chem. 360, 1947 - 1950

41. Mann, K., Geiger, R. und Werle, E. (1976) A Sensitive Kinin Liberating Assay for Kininogenase in Rat Urine, Isolated Glomeruli and Rubules of Rat Kidney. Adv. Exp. Med. Biol. 70, 65 - 73

42. Mann, K., Göring, W., Lipp, W., Keipert, B., Karl, H. J., Geiger, R. und Fink, E. (1980) Radioimmunoassay of Human Urinary Kallikrein Determination of Human Urinary Kallikrein, II. J. Clin. Chem. Clin. Biochem. 18, 395 - 401

43. Moriya, H., Pierce, J. V. und Webster, M. E. (1963) Purification and Some Properties of Three Kallikreins. Ann. N.Y. Acad. Sci. 104, 172 - 185

44. Müller-Esters, W. und Fritz, H. (1980) Interactions of Boar Acrosin with Detergents. Hoppe Seyler's Z. Physiol. Chem. 361, 1673 - 1682

45. Otto, M., Stahlheber, H., Zoelch, M. und Forell, M. M. (1973) Pankreassekretion des Menschen nach Stimulation mit Cholecystokinin, Pankreasenzym, Secretin und Galle Klin. Wschr. 51, 915 - 920

46. Regoli, D. und Barabeé, J. (1980) Pharmacology of Bradykinin and Related Kinins. Pharm. Rev., 32, 1 - 46

47. Trautschold, I. und Werle, E. (1961) Spektrometrische Bestimmung des Kallikreins und seiner Inaktivatoren. Hoppe Seyler's Z. Physiol. Chem. 325, 48 - 59

48. Weber, K. und Osborn, M. (1975) Proteins and Sodium Dodecyl Sulfate: Molecular Weight Determination on Polyacrylamide Gels and Related Procedures. In: The Proteins (Neurath, H. und Mill, R., edd.) 1, ff. 179 - 223, Academic Press, New York

49. Werle, E., Götze, W. und Kappler, A. (1937) Über die Wirkung des Kallikreins auf den isolierten Darm. Biochem. Z, 289, 217 - 233

50. Wilkinson, G. N. (1961) Statistical Estimation in Enzyme Kinetics. Biochem. J. 80, 324 - 332

51. Ziegenhorn, J., Senn, M. und Bücher, T. (1976) Molar Absorptivities of β-NADH and β-NADPH. Clin. Chem. 22, 151 - 160

52. Zimmermann, A., Geiger, R. und Kortmann, H. (1979) Similarity Between a Kininogenase (Kallikrein) from Human Large Intestine and Human Urinary Kallikrein. Hoppe Seyler's Z. Physiol. Chem. 360, 1767 - 1773

Lebenslauf

08.10.1954	in München geboren Vater : Prof.Dr. Gustav Hofmann Mutter: Gertrud Hofmann, geb. Vogl
1961 - 1965	Besuch der Volksschule in München
1965 - 1973	Besuch des Gymnasiums in München, Köln, München
ab Nov. 1973	Studium der Chemie an der LMU München
Feb. 1978	mündlicher Teil der Diplom-Hauptprüfung
ab Nov. 1978	Studium der Medizin an der LMU München
Feb. 1979	Abschluß des Studiums der Chemie Thema der Diplomarbeit: "Untersuchungen des membrangebundenen Adenin-Nukleotid-Translokators mit proteolytischen Enzymen"
März 1980	Ablegung der ärztlichen Vorprüfung
März 1981	Ablegung des ersten Abschnittes der ärztlichen Prüfung

Herrn Professor Dr. rer. nat. Hans Fritz
danke ich für die Überlassung des Themas.

Herrn Dr. rer. nat. Reinhard Geiger
danke ich sehr herzlich für die ausgezeichnete
Betreuung meiner Arbeit.

Herrn Dr. rer. nat. F. Lottspeich
danke ich für die Teilsequenzierung des menschlichen
Pankreas-Kallikreins.

Ferner möchte ich mich bei allen Mitarbeitern des
Arbeitskreises, besonders bei Frau Hirschauer,
Frau Rohrschneider und Frau Vohle-Timmermann für
die gute Zusammenarbeit bedanken.